

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Sylvie Variac et al.

Serial No. To be assigned

Filed: March 15, 2000

For: REAGENT FOR
DETERMINATION OF LEUCOCYTES
AND MEASUREMENT OF
HAEMOGLOBIN IN A SAMPLE OF
BLOOD

Atty Docket: 0198/00053



**SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT(S) and
CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), a certified copy of which is enclosed. The document was filed in a foreign country within the proper statutory period prior to the filing of the above-referenced United States patent application.

<u>Country</u>	<u>Priority Document Serial No.</u>	<u>Filing Date</u>
France	9903467	March 19, 1999

Acknowledgement of this claim and submission in the next official communication is respectfully requested.

Respectfully submitted,

Burton A. Amernick, Reg. No. 24,852
Pollock, Vande Sande & Amernick, R.L.L.P.
1990 M Street, N.W.
Washington, D. C. 20036-3425
Telephone: 202-331-7111

Date:

THIS PAGE BLANK (USPTO)



10530 U.S. PTO
09/527028
03/16/00

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **06 MARS 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **19 03 99**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 03467 -**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **19.03.99**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet NETTER
40, rue Vignon
75009 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

ABX-Aff.8

01 47 42 02 23

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

A B X

Forme juridique

Société Anonyme

Nationalité (s) **française**

Adresse (s) complète (s)

Parc Euromédecine
Rue du Caducée - B.P. 7290
34184 - MONTPELLIER CEDEX 4

Pays

France

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

J. Nuyam
92-1024 (B)(M)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9903667

TITRE DE L'INVENTION :

**Réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine
dans un échantillon de sang**

au nom de A B X

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) Mandataire

**BEZAULT Jean
Cabinet NETTER
40, rue Vignon
75009 - PARIS**

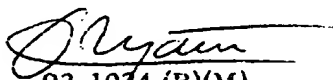
DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- **VERIAC Sylvie**
Les Jardins de l'Alhambra N°7
511, rue Monsieur Teste
34000 MONTPELLIER
- **CHAMPSEIX Henri**
Ploch de Baillos
2, chemin de Cambas
34980 MONTFERRIER SUR LBZ

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS, le 19 mars 1999.


92-1024 (B)(M)

Réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang

5

L'invention se rapporte aux analyses hématologiques.

Elle concerne plus particulièrement un réactif pour la détermination des leucocytes et la mesure de l'hémoglobine dans un échantillon de sang.

10

L'invention vise également à procurer un tel réactif qui permet l'identification d'une sous-population leucocytaire, en particulier les polynucléaires basophiles.

15

La détermination des leucocytes, en particulier de certaines sous-populations leucocytaires, ainsi que la mesure de la concentration en hémoglobine des érythrocytes ou globules rouges sont très importantes pour le diagnostic en pathologie humaine.

20

On rappelle ici que les leucocytes, ou globules blancs humains, sont divisés en cinq sous-populations, à savoir trois sous-populations principales : les lymphocytes, monocytes et polynucléaires ou granulocytes, ces derniers étant eux-mêmes subdivisés en neutrophiles, éosinophiles et basophiles, en fonction des caractéristiques de leurs granules cytoplasmiques.

25

La détermination des leucocytes totaux ainsi que l'identification de leurs différentes sous-populations sont réalisées par l'intermédiaire de techniques traditionnelles d'observation microscopique, ou de techniques plus modernes, fondées principalement sur la mesure de variations de résistivité (WO 84/03771) ou la diffraction optique (US 3 740 143) développées pour des appareils automatiques spécifiques.

30
35

Pour l'identification des sous-populations leucocytaires, la numération des granulocytes basophiles est particulièrement délicate étant donné que cette population ne représente, chez

40

un individu sain, que 0,5 % à 1 % de la population leucocytaire totale.

On observe une augmentation de cette population basophile, qui atteint alors une proportion de 2 à 3 % en poids, lors de réactions allergiques. Parmi les infections, ce sont la tuberculose et la varicelle qui peuvent entraîner une basophilie et, pour les maladies métaboliques, le myxoedème et les hyperlipidémies. Par conséquent, la numération des granulocytes basophiles revêt une importance particulière.

Le Brevet FR 90 01660 et son équivalent US 5 196 346 décrivent un réactif qui préserve les granulocytes basophiles, de façon à permettre leur détermination par mesure de résistivité. Cependant, ce réactif ne permet pas la mesure de l'hémoglobine.

On rappellera que l'hémoglobine est une chromo-protéine contenue dans les globules rouges du sang ou érythrocytes.

La mesure de la concentration en hémoglobine nécessite donc l'utilisation d'un réactif de lyse cellulaire capable de provoquer la lyse des érythrocytes, afin de libérer l'hémoglobine pour sa mesure.

Il est connu pour cela d'utiliser des réactifs contenant au moins un détergent et des ions cyanures capables de procéder à la transformation de l'hémoglobine en un composé chromogène pour permettre sa détermination par mesure de colorimétrie.

Un réactif cyanuré de ce type est décrit dans les Brevets US 3 874 852 et US 3 854 914.

Toutefois, ces réactifs ont pour inconvénient principal d'utiliser du cyanure. De plus, ils ne permettent pas d'identifier et de quantifier les sous-populations leucocytaires contenues dans l'échantillon de sang à analyser.

Il est à noter que des réactifs, ne contenant pas de cyanure et permettant la détermination des leucocytes en plus de la mesure de l'hémoglobine, ont déjà été proposés dans l'art antérieur.

5

Ainsi, le document WO 96 02841 décrit un réactif de mesure de l'hémoglobine sans cyanure, lequel contient un détergent ainsi qu'un sel d'hydroxylamine. Ce réactif peut être utilisé pour la numération des leucocytes totaux, mais aucune
10 différenciation leucocytaire n'est possible.

Le Brevet US 5 242 832 décrit un réactif similaire qui permet également une identification leucocytaire partielle. Cependant, ce réactif ne permet pas l'identification des cellules
15 basophiles, mais seulement l'évaluation des lymphocytes, monocytes et granulocytes.

Le document WO 98 32016 décrit aussi un réactif de ce type. Toutefois, les sous-populations granulocytaires minoritaires, que sont les éosinophiles et les basophiles, ne sont pas
20 identifiées par le réactif décrit dans cette publication.

L'invention a notamment pour but de surmonter les inconvénients des réactifs connus.

25

Elle vise en particulier à procurer un réactif d'analyse hématologique pour la détermination des leucocytes, et en particulier l'identification et la quantification d'une sous-population leucocytaire, que constituent les cellules
30 basophiles, et cela dans un échantillon de sang total.

L'invention vise également à procurer un réactif permettant notamment la lyse des érythrocytes ou globules rouges, nécessaire à la détermination des leucocytes ainsi qu'à la
35 mesure de l'hémoglobine.

Elle vise aussi à procurer un tel réactif d'analyse hématologique sous la forme d'un réactif unique, et non pas d'un système de réactifs.

Elle vise encore à procurer un tel réactif d'analyse hématologique qui ne comporte pas de composés cyanurés.

5 En outre, l'invention vise à procurer un tel réactif hématologique convenant tout particulièrement aux automates hématologiques.

10 L'invention propose à cet effet un réactif d'analyse hématologique du type défini ci-dessus, lequel comprend essentiellement :

- un système tampon propre à ajuster sélectivement le pH du réactif à une valeur acide, en particulier inférieure à 3 ;
- 15 - au moins un détergent de type cationique ; et
- un composé nitrogéné.

20 Le système tampon du réactif est un constituant clé car le pH du réactif permet l'identification de la sous-population constituée par les cellules basophiles, lesquelles sont d'un intérêt particulier.

25 En effet, du fait de leurs caractéristiques biochimiques, les cellules basophiles sont susceptibles de résister plus longtemps que les autres sous-populations leucocytaires à l'agressivité d'un pH acide. Cette propriété permet donc leur isolement et leur identification, notamment par une mesure résistive.

30

Avantageusement, le système tampon est choisi pour que la valeur de pH du réactif soit inférieure à 3, et de préférence égale à 2,4.

35 Le système tampon est avantageusement choisi parmi les suivants :

- chlorure de potassium / acide chlorhydrique ;

- acide tartarique / hydroxyde de sodium ;
- acide citrique / hydroxyde de sodium ;
- 5 - potassium hydrogénophthalate / acide chlorhydrique ;
- acide citrique / di-sodium hydrogénophosphate ; et
- acide borique / acide citrique / potassium dihydrogénophos-
10 phate.

Les détergents de type cationique exercent une fonction de lyse des globules rouges ou érythrocytes, ce qui permet de libérer l'hémoglobine qui peut être ensuite déterminée par
15 mesure d'absorbance. D'une manière générale, les détergents ioniques (anioniques et cationiques), sont principalement utilisés pour dissocier les complexes protéiques et solubiliser les protéines des membranes. Ils sont dits dénaturants. Leur action est rapide et donc compatible avec les contrain-
20 tes de cadence spécifiques aux appareils automatiques.

Le détergent est avantageusement choisi parmi les composés suivants :

- 25 - les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines grasses ;
- les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
- 30 - les amides de diamines substituées, cationisées par le sulfate d'éthyle, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide ; et
- 35 - les amides de diéthylénetriamine cyclisés.

Le composé nitrogéné exerce essentiellement une fonction de stabilisation physico-chimique des dérivés d'oxydation de l'hémoglobine.

Ce composé nitrogéné est avantageusement une thiourée, en particulier la 1,3-diméthyl-2-thiourée.

5 Le réactif de l'invention peut comprendre en outre au moins un sel inorganique.

10 Ce sel, s'il est présent, intervient dans l'activité détergente et permet de maintenir dans les limites de la normalité les phénomènes d'osmose au niveau des membranes cellulaires, ce qui est important pour la détermination des cellules basophiles. Ce sel joue également un rôle dans les méthodes de mesure de résistivité qui sont généralement appliquées dans les automates hématologiques.

15 Le sel inorganique est avantageusement constitué par un sel de métal alcalin. En tant que sels utilisables, on peut citer principalement les chlorures ou sulfates de sodium ou de potassium.

20 De manière préférentielle, le détergent est présent à une concentration de 0,2-20 g/l et le composé nitrogéné à une concentration de 0,1-10 g/l.

25 L'invention sera décrite maintenant en référence à l'exemple non limitatif suivant.

EXEMPLE

30 On prépare un réactif d'analyse hématologique à partir des composés ci-dessous, et dans les concentrations indiquées :

Q

	Composés	Concentrations
	chlorure de potassium	5-10 g/l
	1,3-diméthyl-2-thiourée	0,5-3 g/l
	dodecyltriméthyl ammonium	0,5-5 g/l
5	chlorure	
	potassium hydrogénophosphate/HCl	1,0-10 g/l

10 Les composés ci-dessus sont mélangés et le pH est ajusté à une valeur acide inférieure à 3, et typiquement de l'ordre de 2,4.

15 A l'aide de ce réactif, on procède à des analyses hématologiques sur un échantillon de sang total humain en utilisant un automate d'hématologie.

Pour cela, on met en contact 10 μ l de l'échantillon de sang total avec 2ml du réactif ci-dessus à 35°C.

20 On procède à différents types d'analyses en comparant le réactif de l'invention avec un ou plusieurs réactifs de référence.

25 Le réactif de référence est une lyse utilisée dans les automates hématologiques afin de reproduire le dosage de l'hémoglobine suivant la méthodologie classique, non automatique, dite de Drabkin. Il s'agit du dosage de la cyanméthémoglobine.

30 Selon cette méthode, le fer ferreux (Fe^{++}) de l'hème des hémoglobine, oxyhémoglobine et carboxyhémoglobine contenues dans les globules rouges est oxydé en fer ferrique (Fe^{+++}) par le cyanure de fer pour former la méthémoglobine. La méthémoglobine se combine ensuite avec des ions cyanure
 35 pour former la cyanméthémoglobine, laquelle est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm [Drabkin, J. Biol. Chem. 112:51 (1935)].

Par contre, le réactif de l'invention est utilisé dans un mode de dosage sans cyanure. L'hémoglobine érythrocytaire est éluee par l'action d'un agent de lyse approprié. Le fer hémique de l'hémoglobine éluee est oxydé par l'action combinée du composé érythrolytique et de l'oxygène dissous dans la solution. La méthémoglobine libre est instable si on la compare à la cyanméthémoglobine. On utilise donc des composés ayant des atomes donneurs d'électrons pour réduire le fer hémique et stabiliser la méthémoglobine.

Le réactif de l'invention est utilisé pour différents types d'analyses effectuées sur un automate hématologique.

1) Numération des leucocytes

On procède à une numération des leucocytes ou globules blancs totaux.

On compare les résultats de mesure obtenus avec le réactif de l'invention et avec un réactif de référence qui ne permet pas de différenciation leucocytaire même partielle.

La figure 1 montre les valeurs de mesures exprimées en milliers de cellules, d'une part pour le réactif de référence représenté en abscisse, et d'autre part pour le réactif de l'invention représenté en ordonnée.

Le graphique montre une excellente corrélation entre les deux types de mesures. Les valeurs du coefficient de corrélation ($R^2 = 0,99$) et de la pente de la droite de régression ($0,99$) indiquent une très bonne corrélation.

2) Différenciation et numération des polynucléaires basophiles

La figure 2 montre la courbe résultant de l'analyse résistive d'un échantillon de sang total avec le réactif de l'invention décrit plus haut. Cette courbe représente un

histogramme de répartition des cellules en fonction de leurs tailles.

L'axe des x (abscisse) correspond à la détermination des volumes cellulaires (μ^3) calculés par une mesure résistive. Les polynucléaires basophiles se situent à droite du curseur central (BAS). A gauche de ce curseur central se trouvent toutes les autres sous-populations leucocytaires non différenciables volumétriquement du fait de la forte agressivité du pH du réactif.

Dans l'exemple, on identifie des polynucléaires basophiles qui représentent une proportion de 6,2 % (en volume) par rapport à la population leucocytaire totale.

15

3) Mesure de l'hémoglobine

On effectue une mesure de l'hémoglobine avec le réactif de l'invention et on compare les résultats de mesures de la concentration en hémoglobine avec le réactif de l'invention et un réactif de référence contenant des composés cyanurés.

20

La figure 3 montre les valeurs de concentrations en hémoglobine (exprimées en grammes/litre) obtenues par le réactif de référence (représentation en abscisse) et le réactif de l'invention (représentation en ordonnée). Là encore, les valeurs du coefficient de corrélation ($R^2 = 0,99$) et de la pente de la droite de régression (1,09) indiquent une très bonne corrélation.

25

30

Ainsi, l'invention procure un réactif unique qui permet la détermination des leucocytes, l'identification d'une sous-population leucocytaire (en particulier les polynucléaires basophiles) et la mesure de l'hémoglobine, et cela sans utilisation de composés cyanurés.

35

Le réactif de l'invention présente notamment la particularité de permettre la mesure de l'hémoglobine dans des conditions très acides par rapport aux réactifs connus.

En outre, ce réactif se présente sous la forme d'un réactif unique, et non d'un système de plusieurs réactifs, et il convient tout spécialement aux analyses effectuées sur des automates hématologiques.

5

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée à l'exemple de réalisation décrit précédemment et s'étend à d'autres variantes de réalisation.

Q

Revendications

1. Réactif pour la détermination des leucocytes et des polynucléaires basophiles, ainsi que pour la mesure de
5 l'hémoglobine dans un échantillon de sang,

caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 - un système tampon propre à ajuster sélectivement le pH du réactif à une valeur acide, en particulier une valeur inférieure à 3 ;
- au moins un détergent de type cationique ;
- 15 - un composé nitrogéné.

2. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le système tampon est propre à ajuster le pH à une valeur égale à 2,4.

20

3. Réactif selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le système tampon est choisi parmi :

- chlorure de potassium / acide chlorhydrique ;
- 25 - acide tartarique / hydroxyde de sodium ;
- acide citrique / hydroxyde de sodium ;
- 30 - potassium hydrogénophthalate / acide chlorhydrique ;
- acide citrique / di-sodium hydrogénophosphate ; et
- acide borique / acide citrique / potassium dihydrogéné-
35 phosphate.

4. Réactif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi :

Q

- les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines grasses ;
 - les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
 - les amides de diamines substituées, cationisées par le sulfate d'éthyle, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide ; et
 - les amides de diéthylénetriamine cyclisés.
5. Réactif selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé nitrogéné est une thiourée, en particulier la 1,3-diméthyl-2-thiourée.
6. Réactif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un sel inorganique.
7. Réactif selon la revendication 6, caractérisé en ce que le sel inorganique est un sel de métal alcalin.
8. Réactif selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisé en ce que le sel inorganique est choisi parmi les chlorures et sulfates de sodium ou de potassium.
9. Réactif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le détergent est présent à une concentration de 0,2-20 g/l et le composé nitrogéné à une concentration de 0,1-10 g/l.

10. Réactif selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par la composition suivante :

	Composés	Concentrations
5	chlorure de potassium	5-10 g/l
	1,3-diméthyl-2-thiourée	0,5-3 g/l
	dodecyltriméthyl ammonium chlorure	0,5-5 g/l
	potassium hydrogénophosphate/HCl	1,0-10 g/l

10

13 faser


CABINET NETTER

1/2

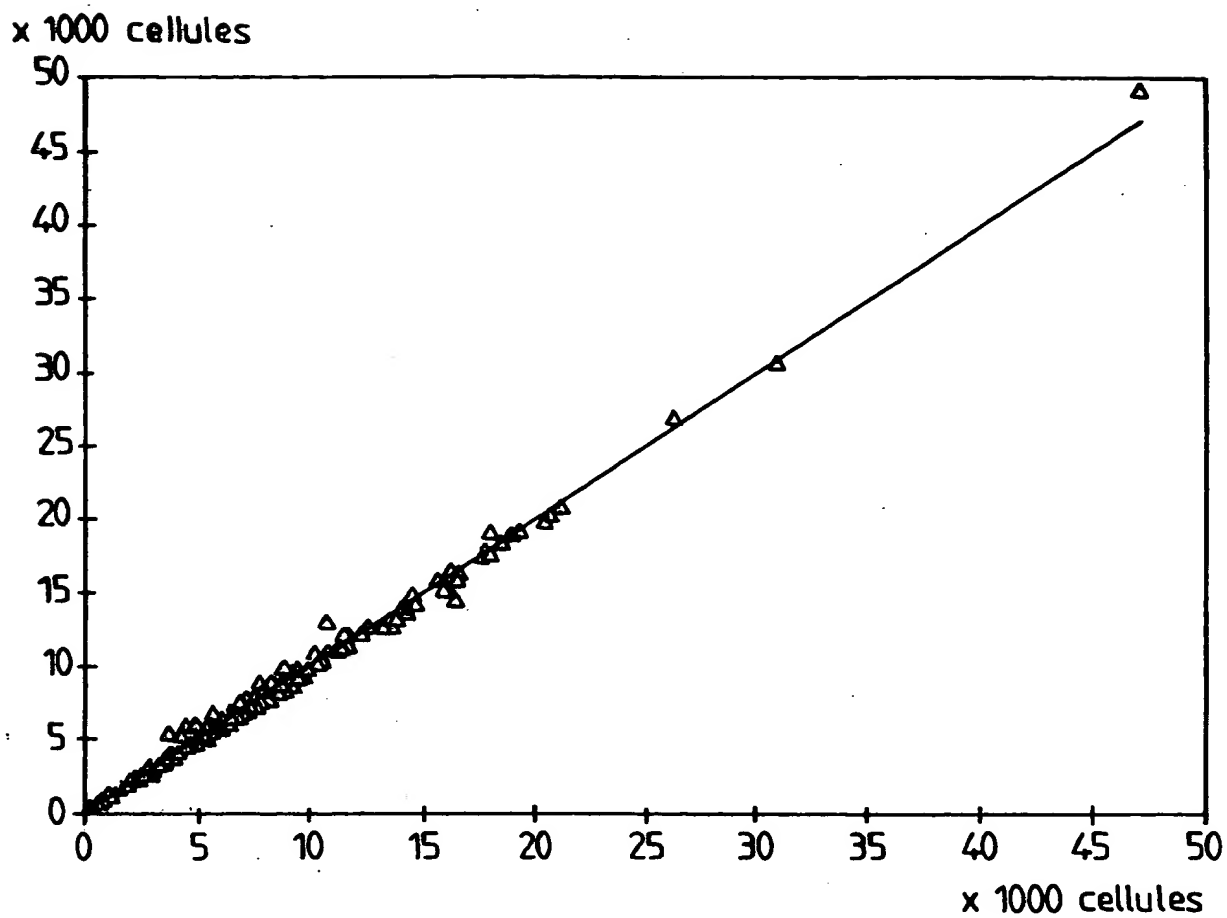


FIG.1

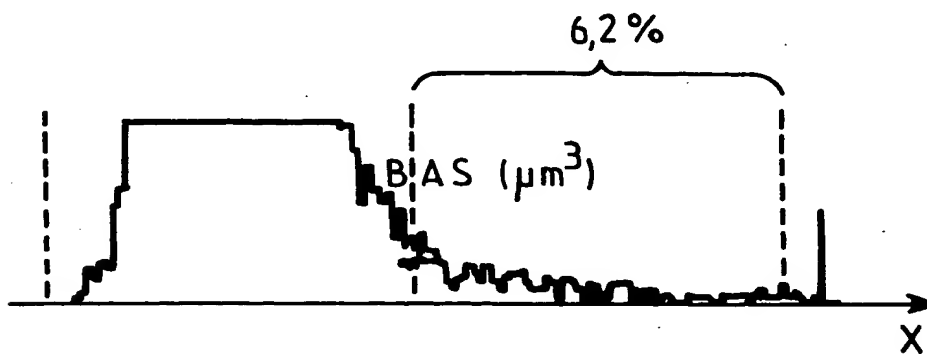


FIG.2

2/2

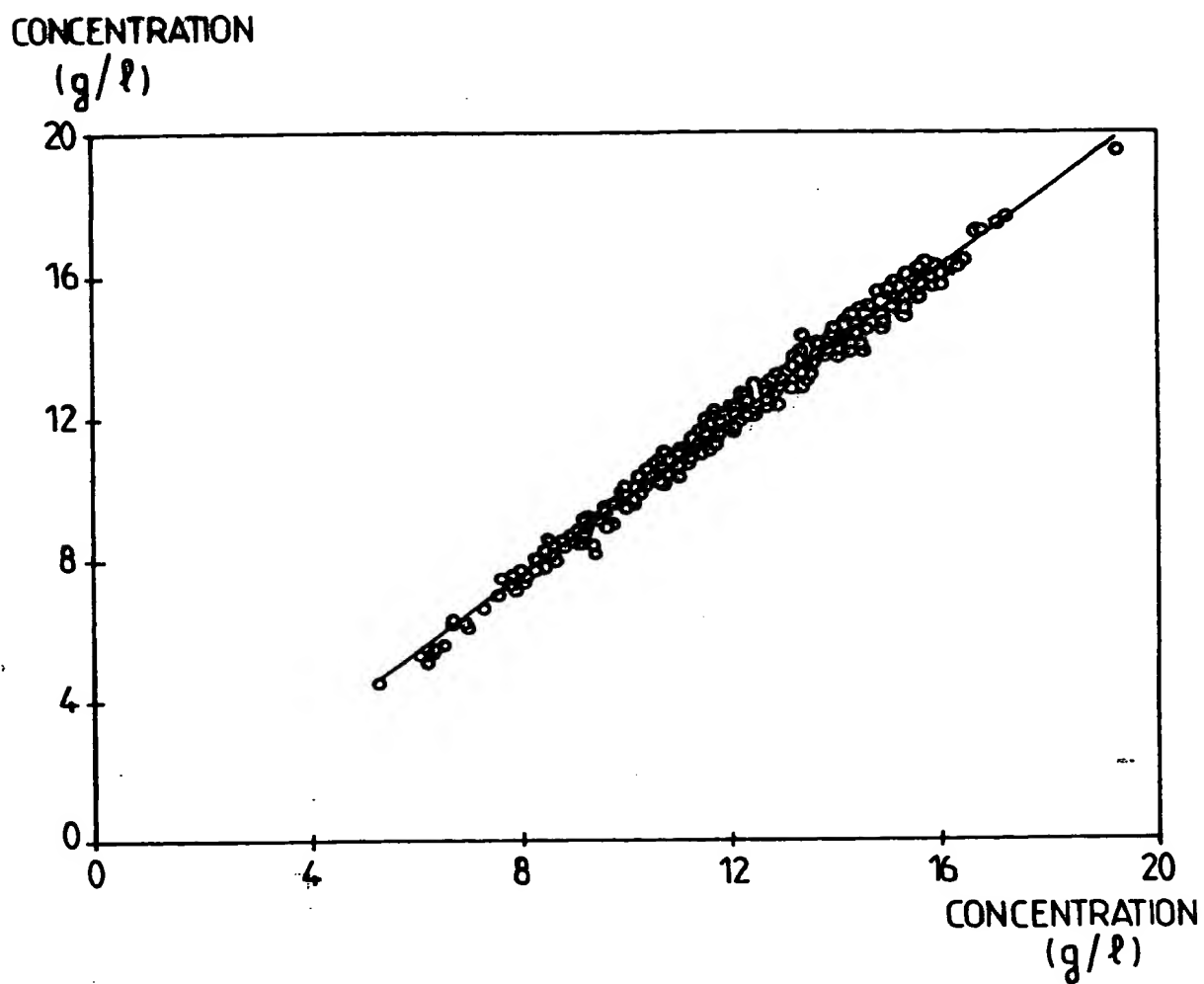


FIG.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)